

Le dosage sanguin de la méthadone par la technique FPIA : application au suivi des patients en traitement de substitution aux opiacés

Methadone blood assay by the FPIA technique: application to the monitoring of patients in maintenance treatment to opiates

C. Boglione-Kerrien¹

Y. Furet¹

J. Bachellier²

G. Paintaud¹

E. Autret-Leca¹

¹ Service de pharmacologie,
CHRU de Tours, Tours

² Centre spécialisé de soins
aux toxicomanes (CSST)
Port-Bretagne, Tours

Résumé. De grandes variations pharmacocinétiques interindividuelles sont observées avec la méthadone, traitement de substitution des pharmacodépendances majeures aux opiacés. Il est donc indispensable d'individualiser la posologie en fonction des signes cliniques notés chez le patient, pouvant indiquer *a priori* un surdosage ou un syndrome de sevrage, mais ils manquent de spécificité. Par ailleurs, une mauvaise réponse au traitement (posant la question de l'observance) ou l'existence possible d'interactions médicamenteuses peuvent rendre nécessaire la réalisation de dosages sanguins de la méthadone. Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de ces patients se fonde sur la détermination des concentrations sanguines résiduelles de méthadone, réalisable par chromatographie (CPG ou HPLC) constituant les méthodes de référence, ou bien par méthode immunochimique, donnant des résultats plus rapides. Compte tenu des données de la littérature, il a été choisi de réaliser ce dosage par polarisation de fluorescence (technique FPIA) sur un analyseur automatique de type Tdx-FLx. Nous avons mis en évidence l'absence d'« effet matrice » et réalisé une comparaison avec une technique de référence, la CPG-SM (chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse) à partir de prélèvements sanguins obtenus chez des sujets traités. D'autre part, l'étude de la littérature a permis de fixer la cible thérapeutique à 400 ng/mL. Des concentrations résiduelles de méthadone inférieures à 100 ng/mL sont considérées comme inefficaces, alors que celles supérieures à 1000 ng/mL correspondent souvent à un surdosage. La zone de linéarité de notre technique d'analyse se situe entre 50 et 500 ng/mL, ce qui est satisfaisant. L'étude de différents cas cliniques en coopération avec le CSST (centre spécialisé de soins aux toxicomanes) Port-Bretagne de Tours a montré que ce dosage permettait d'aider le médecin clinicien dans l'adaptation posologique du traitement par la méthadone.

Mots clés : méthadone, suivi thérapeutique, dosage sanguin, technique FPIA

Abstract. A large inter-individual variability in methadone pharmacokinetics is observed in patients under maintenance treatment for major addiction to opiates. Therefore an individual dose titration of methadone is necessary, based on clinical response, i.e. symptoms of overdosage or withdrawal syndrome, but these symptoms are unspecific. However, a poor response to methadone treatment (asking for drug compliance) or the possibility of drug interactions may require the determination of methadone blood concentrations. Therapeutic drug monitoring (TDM) of those patients is performed using methadone trough blood concentrations measured by chromatography (GC or HPLC: reference methods) or by immunoassay, which gives more rapid results. A review of the

Article reçu le 27 février 2006,
accepté le 25 octobre 2006

doi: 10.1684/abc.2007.0024

literature led us to use the fluorescence polarisation immunoassay (FPIA technique) performed on a TDx-FLx analyzer. We confirmed the lack of "matrix effect" and FPIA was compared to GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) on patients samples. According to the literature, a methadone trough serum concentration target of 400 ng/mL is recommended; results under 100 ng/mL are considered as clinically ineffective, whereas methadone concentrations above 1000 ng/mL are frequently associated with drug toxicity. The linearity domain of the technique stays between 50 and 500 ng/mL, which is satisfactory. We describe some clinical cases from the Methadone Treatment Center of Tours (Centre Port-Bretagne), which showed that methadone blood concentration measurement may be helpful to achieve the optimal dose of methadone in each patient.

Key words: *methadone, therapeutic drug monitoring, blood assay, FPIA technique*

De grandes variations pharmacocinétiques interindividuelles sont observées avec la méthadone, traitement substitutif des pharmacodépendances majeures aux opiacés [1]. La détermination des concentrations sanguines de la méthadone permet de réaliser le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des patients en traitement de substitution. Le STP constitue un outil d'aide à l'adaptation posologique individualisée, pouvant être utilisé par le clinicien pour des patients non stabilisés par leur traitement. Le dosage sanguin de la méthadone peut être réalisé par des techniques chromatographiques ou immunochimiques. Nous avons choisi d'utiliser la méthode immunochimique par polarisation de fluorescence (FPIA) avec l'utilisation du kit Abbott théoriquement adapté au dosage urinaire de la méthadone. En effet, quatre études valident ce type de dosage : Beck et al. [2], Dessalles *et al.* [3], Kell *et al.* [4] et Pollet *et al.* [5]. Ces auteurs ont utilisé le kit de réactifs Abbott, et ont réalisé eux-mêmes les calibrateurs et les contrôles avec du sérum ou plasma ne contenant pas de méthadone. Différentes fourchettes thérapeutiques ont été proposées, mais plusieurs travaux ont montré qu'une concentration cible de 400 ng/mL permet une stabilisation médico-psycho-sociale des patients [6-8]. Nous avons retenu cette valeur cible, ainsi qu'une limite inférieure d'efficacité de 100 ng/mL et une limite supérieure de toxicité de 1 000 ng/mL. Les objectifs de ce travail ont été d'évaluer les performances de la technique par FPIA pour le dosage sanguin de la méthadone, et de l'appliquer au suivi thérapeutique des patients. Ainsi, l'absence d'« effet matrice » a été vérifiée et la technique FPIA a été comparée avec la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Nous avons ensuite étudié quelques cas cliniques de patients traités par la méthadone.

Patients et méthodes

Patients

Huit patients, mal stabilisés par leur traitement de substitution par la méthadone, ont été suivis en collaboration étroite avec le CSST (centre spécialisé de soins aux toxicomanes). Dix échantillons de sang de ces patients ont été utilisés pour la comparaison des 2 techniques de dosage de la méthadone sanguine. Deux tubes secs d'un volume total minimal de 7 mL étaient demandés pour permettre le dosage sérique par les 2 types de techniques. Le prélèvement a été effectué 22 à 24 heures après la prise du traitement, juste avant la prise suivante, pour mesurer la concentration résiduelle.

Étalons

Des étalons ont été réalisés pour l'étude de l'absence d'effet matrice. Quatre concentrations ont été testées : 50, 100, 400 et 1 000 ng/mL. Ces étalons ont été préparés à partir de méthadone et de plasma ne contenant pas de méthadone. Celui-ci a été obtenu auprès de l'établissement français du sang, et la méthadone auprès de la société Promochem, après autorisation de l'Afssaps, sous forme d'ampoules dosées à 1 mg/mL. L'étalon à 1 000 ng/mL a été dilué pour obtenir des valeurs comprises dans la zone de linéarité.

Évaluation des performances de la technique adaptée au dosage sanguin

L'étude analytique a porté sur les 2 points suivants :
– montrer l'absence d'effet matrice lors de l'utilisation du kit de dosage Abbott. La précision et l'exactitude de la technique FPIA ont été évaluées ;

– comparer les concentrations sériques obtenues par cette technique à celles obtenues avec la technique de référence CPG-SM. Ceci a été réalisé sur 10 échantillons de patients.

Les échantillons ont été congelés à -20°C , en attente de leur envoi dans la glace au laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Limoges, où l'analyse par la technique CPG-SM a été réalisée.

Matériel

Ont été utilisés la trousse immunologique Abbott (référence 9676-60) et automate TDx-FLx (Abbott Diagnostic, 12 rue de la couture, Silic 203, 94518 Rungis cedex, France).

Le dosage requiert un coffret-réactifs permettant de réaliser environ 100 analyses et comprenant une solution de prétraitement tamponnée, un antisérum anti-méthadone dans un tampon, un traceur de la méthadone marqué à la fluorescéine et une solution de lavage. Le coffret de calibrateurs de matrice urinaire (référence 9676-02) permet de réaliser une gamme d'étalonnage en 6 points (0-150-250-500-1 000-4 000 ng/mL). La zone d'intérêt clinique pour le dosage sanguin s'étend de 0 à 1 000 ng/mL environ. La zone de linéarité de la courbe de calibration s'étendant de 50 à 500 ng/mL, il convenait donc d'effectuer une dilution de l'échantillon pour les valeurs supérieures à 500 ng/mL. Ceci a été réalisé à l'aide du tampon FPIA. Le contrôle utilisé a été le contrôle à 300 ng/mL du coffret de contrôles du laboratoire Abbott (référence 9676-10). L'automate TDx-FLx permet le dosage de nombreux médicaments par la méthode FPIA en un temps réduit d'environ 15-20 minutes. La sensibilité retenue a été de 50 ng/mL après analyse d'études similaires [2-4].

L'analyse a été réalisée sur 100 μL de sérum ou plasma, après une étape préalable de centrifugation du tube de sang (5 minutes à 3 500 tr/min). Le programme adapté au dosage urinaire de la méthadone a pu être utilisé sans modification, mis à part la valeur du seuil qui a été fixée arbitrairement.

Résultats

Absence d'effet matrice

Blanc

La déviation de la lumière polarisée du blanc dans la matrice urinaire est de 180 et correspond au zéro de la gamme de calibration, la polarisation moyenne du blanc dans la matrice plasmatique est de 182,5. Ces valeurs de polarisation sont sensiblement identiques. La nature de la matrice n'interfère donc pas.

Étalons

La précision et l'exactitude ont été calculées à partir de 5 déterminations. Les résultats sont résumés dans le *tableau 1*. Le coefficient de variation était inférieur à 6 % ce qui est très satisfaisant (on considère qu'il doit être inférieur à 15 % [9]). L'inexactitude était inférieure à $\pm 8\%$, ce qui est acceptable (elle doit être inférieure à 15 % [9]).

Comparaison des techniques FPIA et CPG-SM

Le *tableau 2* récapitule les valeurs des concentrations sériques de méthadone obtenues par les 2 méthodes sur 10 échantillons de patients. La fourchette des valeurs obtenues par chromatographie s'étendait de 35 à 1 494 ng/mL. L'erreur relative (ER) acceptable doit être de $\pm 15\%$. Les valeurs grisées sont celles dont l'ER était supérieure à $\pm 15\%$. Ceci correspond aux limites de la méthode abordées dans la discussion. L'erreur absolue moyenne sur les 10 échantillons était de - 64 ng/mL (extrêmes : - 319 et 17), pour une valeur moyenne de concentration de 576 ng/mL. L'erreur relative moyenne était de - 11 %. La *figure 1* représente la corrélation entre les techniques FPIA et CPG-SM. Le coefficient de détermination R^2 était de 0,99.

La relation entre les 2 techniques était linéaire, selon l'équation $y = 0,82x + 38$, sur l'étendue des valeurs 35-1494 ng/mL.

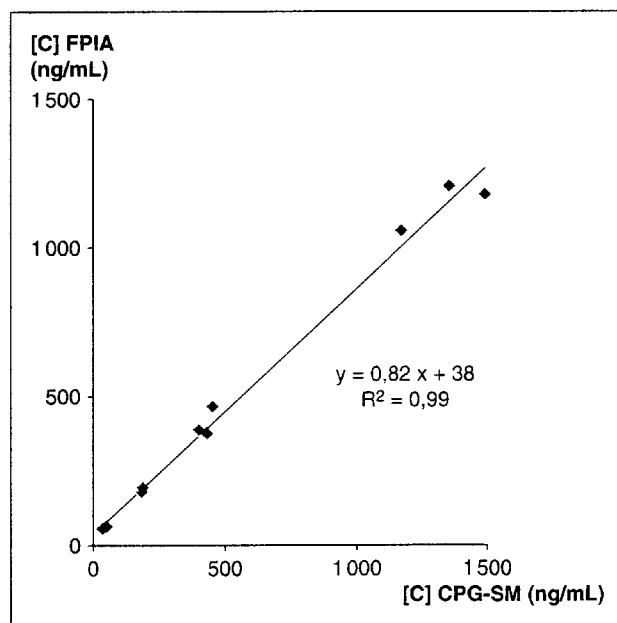


Figure 1. Comparaison de 2 techniques de dosage de la méthadone sanguine.

Discussion

Aspects analytiques

Discussion des résultats

Il n'y a pas d'effet matrice : le kit urinaire commercialisé est donc utilisable pour le dosage dans une matrice sérique. La technique FPIA est précise pour le dosage sanguin de la méthadone. L'exactitude, calculée pour les 10 échantillons de patients, donne une erreur relative $< \pm 15\%$ pour 7 prélèvements. Les valeurs des 3 autres prélèvements correspondent aux limites de la méthode exposées dans le point suivant. Les 2 méthodes sont bien corrélées ($R^2 = 0,99$). La dispersion des valeurs par rapport à la droite de régression est faible. Ceci a d'ailleurs été validé dans d'autres études [2-4]. Notons que les prélèvements de valeur supérieure à 1 000 ng/mL ne correspondent pas à la réalité clinique et ne sont d'ailleurs pas des concentrations résiduelles.

Les limites de la méthode FPIA

Deux zones de concentration présentent une inexactitude importante (supérieure à 15 %) :

- la zone voisine de 50 ng/mL, qui est la valeur limite de quantification. Deux valeurs de dosage ont été rapportées comme étant légèrement supérieures à 50 ng/mL pour des valeurs de référence déterminées par CPG-SM inférieures à 50 ng/mL : il y a donc une légère surestimation autour de cette valeur, mais cette imprécision est acceptable car l'information fournie demeure suffisante pour le STP ;

- la zone supérieure à 1 000 ng/mL est également source d'inexactitude : dans cette zone, les valeurs sont sous-estimées de 21 %. À noter que ces valeurs n'ont pas pu être interprétées cliniquement car elles ne correspondaient pas à de vraies valeurs résiduelles. Les concentrations supérieures à 1 000 ng/mL sont normalement très rares car toxiques. Et on peut considérer qu'au-dessus de 600-800 ng/mL, une certaine vigilance est requise (survenue d'effets indésirables). La fiabilité de la technique par polarisation de fluorescence dans le dosage sanguin de la méthadone a été confirmée par l'ensemble des résultats. Il convient bien entendu de prendre en compte les limites de cette méthode pour ce type de dosage.

Notons également quelques avantages de la FPIA, communs à d'autres méthodes immunochimiques.

Tableau 1. Étude de l'absence d'effet matrice : précision et exactitude évaluées avec 4 étalons.

	Cible (ng/mL)	M (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	ET (%)
Répétabilité	50	46,8	1,1	2,4	- 6,4
	100	100,6	2,9	2,9	0,6
	400	401,6	5,0	1,2	0,4
	1 000	981,4	19,0	1,9	- 1,9
Reproductibilité	50	46,2	2,6	5,6	- 7,6
	100	95,6	4,2	4,4	- 4,4
	400	392,2	10,0	2,5	- 2,0
	1000	961,8	11,1	1,2	- 3,8

M = moyenne des valeurs obtenues ; SD = écart-type ; CV = coefficient de variation ; ET = erreur totale = (m-cible) x 100/cible.

Tableau 2. Comparaison des valeurs de concentrations sériques de méthadone par les méthodes FPIA et CPG-SM.

Cas cliniques	[c] FPIA	[c] CPG-SM	ER %
n° 1	462	452	2,20
n° 2	190	187	1,60
n° 3	176	183	- 3,80
n° 4	52	35	49
n° 5	59	50	18
Autres prélèvements	[c] FPIA	[c] CPG-SM	ER %
n° 6	1 175	1 494	- 21
n° 7	1 203	1 357	- 11
n° 8	1 053	1 174	- 10
n° 9	383	400	- 4
n° 10	371	432	- 14

[C] : concentration sérique de méthadone en ng/mL. ER % : erreur relative par rapport à la valeur de référence ([C] CPG-SM), donnée en pourcentage (exactitude ou justesse). Note : les 5 premiers prélèvements correspondent à des cas cliniques dont les caractéristiques sont exposées dans le tableau 3.

Tableau 3. Résumé des caractéristiques cliniques de 5 patients sous méthadone étudiés en STP.

Cas clinique	Sexe	Âge (ans)	Dose de méthadone (mg)	Clinique	Indication du dosage sanguin
n° 1	F	38	140	Mal-être Poursuite de l'usage illicite d'opiacés	Éventuel sous-dosage
n° 2	H	34	35	Asthénie	Éventuel sous-dosage
n° 3	H	33	100	Prise de poids	Vérification des concentrations sanguines efficaces
n° 4	H	54	40	Signes de manque aux opiacés	Interaction médicamenteuse
n° 5	F	35	20	Bien équilibrée avec son traitement	Suivi de grossesse

Les avantages de la technique FPIA

L'obtention des résultats est rapide. Le dosage est réalisé en 30 minutes environ, directement sur le sérum ou le plasma. Un faible volume d'échantillon est requis pour la technique FPIA, évalué à 0,5 mL de sang (environ 2 mL nécessaires pour la chromatographie). L'avantage n'est pas négligeable dans les cas de patients difficiles à prélever. Ainsi, la technique de micro-prélèvement en capillaire peut être utilisée avec la technique de dosage par polarisation de fluorescence. La facilité dans la réalisation du dosage est un atout supplémentaire. Aucune compétence technique spécifique n'est nécessaire.

Aspects cliniques

Les difficultés pratiques rencontrées

L'établissement de la zone thérapeutique a été difficile à définir après l'étude de la littérature, car les fourchettes de concentrations thérapeutiques varient largement de 100 à 1 000 ng/mL. Mais l'analyse bibliographique a permis de retenir l'objectif d'une concentration-cible de 400 ng/mL, souligné par certains auteurs [6-8] et reconnu dans les consensus actuels. Le prélèvement du sang du patient est un point très délicat du STP. Il n'a pas été réalisé directement au CSST : le patient a donc dû entreprendre une démarche volontaire pour se faire prélever, ce qui est parfois difficile à obtenir en pratique. De plus, un volume sanguin minimal a été requis pour permettre le dosage par les deux techniques. Or le prélèvement peut être difficile à réaliser du fait du mauvais état du réseau veineux du patient (ex-usager d'héroïne par voie intraveineuse). Enfin, l'obtention d'une concentration résiduelle peut être difficile avec des patients suivis en ambulatoire.

Intérêt du dosage sanguin de la méthadone dans le STP

L'analyse des dossiers des patients en collaboration avec le CSST et la confrontation clinico-biologique ont été nécessaires pour l'interprétation des résultats des dosages sanguins dans le STP des patients.

La détermination des concentrations sériques de méthadone s'est avérée utile dans divers cas : lors de la suspicion de sous-dosage, lors d'interaction médicamenteuse avec un traitement anti-rétroviral, lors d'un suivi de grossesse, pour justifier auprès du patient de l'inadéquation de la dose. Ces quelques exemples de cas cliniques sont résumés dans le *tableau 3* et détaillés dans l'*Annexe 1*.

Dans ces divers exemples, le dosage sanguin a permis d'aider le clinicien à adapter individuellement la posologie dans un contexte clinique précis et de participer à une meilleure prise en charge du patient [10].

Conclusion

Ce travail a permis la mise en place du STP chez des patients non stabilisés par leur traitement par la méthadone, en coopération avec le CSST de Tours. La technique FPIA s'est révélée suffisamment précise et exacte pour le dosage sanguin de la méthadone, et utilisable directement avec l'ensemble du kit commercialisé initialement pour le dosage urinaire. La réussite de la prise en charge d'un patient traité par la méthadone passe par la bonne coordination d'une équipe multidisciplinaire, à laquelle peut s'ajouter l'aide du pharmacologue. L'aspect pharmacologique du traitement de substitution par la méthadone est très important, mais le soutien psychologique et social au sein d'une structure est déterminant dans l'amélioration de la vie du patient.

Références

1. Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone : implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet* 2002 ; 41 : 1153-93.
2. Beck O, Boreus L, Borg S, *et al.* Monitoring of plasma methadone : intercorrelation between immunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 1990 ; 12 : 473-7.

de mémoire d'interne

3. Dessalles MB, Gasdeblay S, Mahuzier G. Détermination de la méthadone sérique à l'aide d'une trousse immunologique et comparaison avec une méthode en chromatographie liquide. *Ann Biol Clin (Paris)* 1996 ; 54 : 203-9.
4. Kell MJ, Techman T. Rapid measurement of plasma methadone in a clinical setting using fluorescence polarization immunoassay. *J Addict Dis* 1996 ; 15 : 69-83.
5. Pollet J, Sarran A, Daumain P, *et al.* Validation d'un dosage de méthadone sérique sur l'AxSYM. *Toxicorama* 1997 ; 9 : 41-3.
6. Eap CB, Bourquin M, Martin J, *et al.* Plasma concentrations of the enantiomers of methadone and therapeutic response in methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend* 2000 ; 61 : 47-54.
7. Loimer N, Schmid R, Grunberger J, *et al.* Psychophysiological reactions in methadone maintenance patients do not correlate with methadone plasma levels. *Psychopharmacology (Berl)* 1991 ; 103 : 538-40.
8. Tennant FS. Inadequate plasma concentrations in some high-dose methadone maintenance patients. *Am J Psychiatry* 1987 ; 144 : 1349-50.
9. Shah V, Midha K, Findlay J, *et al.* Bioanalytical method validation-A revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000 ; 17 : 1551-7.
10. Marquet P. *Suivi thérapeutique pharmacologique : pour l'adaptation de posologie des médicaments*. Collection Option/Bio. Paris : Elsevier, 2004.